

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

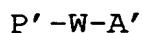
International Application No

PCT/GB 99/01800

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DELGADO, C. (1) ET AL: "Enhanced tumour specificity of an anti-carcinoembryonic antigen Fab' fragment by poly(ethylene glycol) (PEG) modification." BRITISH JOURNAL OF CANCER. (1996) VOL. 73, NO. 2, PP. 175-182. , XP002084719 the whole document -----	1-15
P,Y	HUMPHREYS, DAVID P. ET AL: "F(ab') ₂ molecules made from Escherichia coli produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model" J. IMMUNOL. METHODS (1998), 217(1-2), 1-10 , XP000416507 page 1 -page 2 page 9 -----	1-15

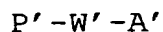
2. Scope of Claims

(1) An immunotoxin obtained by coupling the A chain of ricin with an antibody, having the following general formula

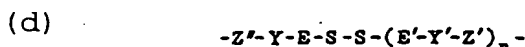
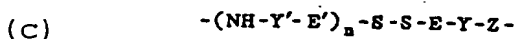
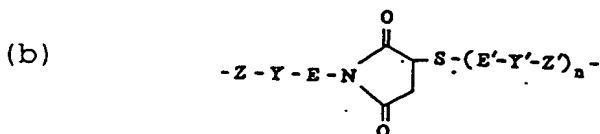
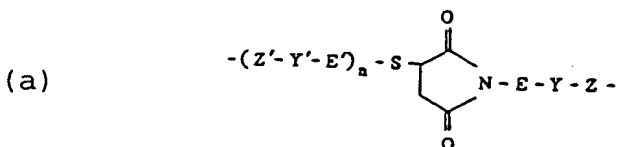


(wherein P' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of an antibody or a fragment of the antibody, A' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of the A chain of ricin, and W represents a divalent covalent bond structure containing a thioether or disulfide group, provided that in the disulfide group the both sulfur atoms are those of cystines in P and A, or connected to an atomic group belonging to the P and A or either one of them; in the latter case, the both sulfur atoms are connected to the atomic group through an interposed molecule having a functional group that is connected to the atomic group belonging to the P and A or either one of them, provided that when W contains a disulfide group, if one of the sulfur atoms of the disulfide group belongs to one of cystines in the A, then the other sulfur is connected to the protein P through an interposed molecule having a functional group connected to a group of the protein P other than an amino group).

(2) An immunotoxin obtained by coupling the A chain of ricin with an antibody P, having the following general formula



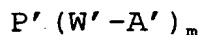
[wherein P' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of an antibody or a fragment of the antibody, A' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of the A chain of ricin, and W' represents a covalent bond structure selected from the following groups



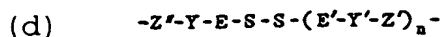
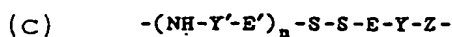
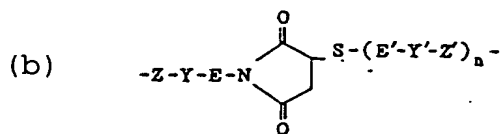
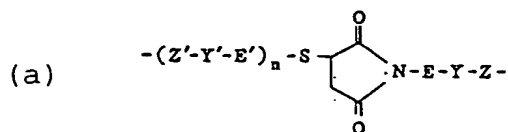
(wherein Z and Z' represent atomic groups belonging to the proteins A and P and are selected from an oxygen atom derived from a hydroxyl group of one tyrosine residue, a carbonyl group derived from one of terminal or free carboxyl groups of glutamic acid and aspartic acid or either one of the A and P, a group derived from a dialdehyde structure obtained after oxidation of the sugar chain of the P with periodic acid, and a -NH- group derived from one of amines at the ε-position of one ricin residue or one of terminal amines of the A and P, and Z'' is the same as the Z and Z' above but cannot be

-NH-, Y and Y'' represent functional groups that can covalently bind to one of Z, Z' and Z'' groups of the protein P and A, E and E' represent inactive interposed molecules, and n is 0 or 1)].

(3) An immunotoxin obtained by coupling an antibody P with the A chain of ricin, having the following general formula



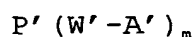
(wherein m represents a numerical value of 0.3 to 12, P' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of an antibody or a fragment of the antibody, A' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of the A chain of ricin, and W' represents a covalent bond structure selected from the following groups:



(wherein Z and Z' represent atomic groups belonging to the proteins A and P and are selected from an oxygen atom derived from a hydroxyl

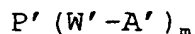
group of one tyrosine residue, a carbonyl group derived from one of terminal or free carboxyl groups of glutamic acid and aspartic acid or either one of the A and P, a group derived from a dialdehyde structure obtained after oxidation of the sugar chain of the P with periodic acid, and a -NH- group derived from one of amines at the ε-position of one ricin residue or one of terminal amines of the A and P, and Z'' is the same as the Z and Z' above but cannot be -NH-, Y and Y'' represent functional groups that can covalently bind to one of Z, Z' and Z'' of the protein P and A, E and E' represent inactive interposed molecules, and n is 0 or 1)].

(4) An immunotoxin according to claim 3, represented by the following general formula



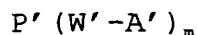
(wherein W' and A' are the same as defined in claim 3, P' represents a fragment of antibody Fab or Fab', and m represents a number in the range of 0.3 to 2).

(5) An immunotoxin according to claim 3, represented by the following general formula



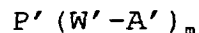
(wherein W' and A' are the same as defined in claim 3, P' represents a fragment of antibody F(ab')₂, and m represents a number in the range of 0.5 to 4).

(6) An immunotoxin according to claim 3, represented by the following general formula



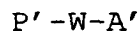
(wherein W' and A' are the same as defined in claim 3, P' represents an antibody of IgM type, and m represents a number in the range of 0.5 to 6).

(7) An immunotoxin according to claim 3, represented by the following general formula



(wherein W' and A' are the same as defined in claim 3, P' represents an antibody of IgM type, and m represents a number in the range of 1 to 12).

(8) A method of producing an immunotoxin represented by the following general formula

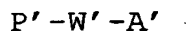


(wherein P' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of an antibody or a fragment of the antibody, A' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of the A chain of ricin, and W represents a divalent covalent bond structure containing a thioether or disulfide group, provided that in the disulfide group the both

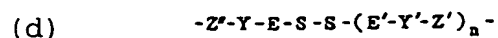
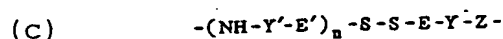
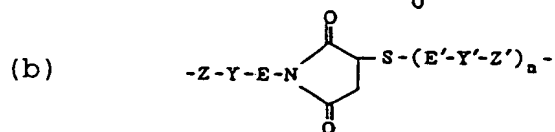
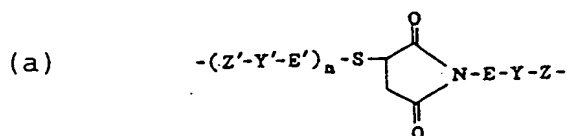
sulfur atoms are those of cystines in P and A, or connected to an atomic group belonging to the P and A or either one of them; in the latter case, the both sulfur atoms are connected to the atomic group through an interposed molecule having a functional group that is connected to the atomic group belonging to the P and A or either one of them, provided that when W contains a disulfide group, if one of the sulfur atoms of the disulfide group belongs to one of cystines in the A chain of ricin, then the other sulfur atom is connected to the protein P through an interposed molecule having a functional group connected to a group of the protein P other than an amino group), characterized by reacting P₁, which is a protein having at least one free thiol group bonded thereto directly or through an interposed group and is the chain A of ricin, modified in accordance with a case, antibody or a fragment of the antibody with P₂, which is a protein other than the protein P₁ having an atomic group that can bind to the free thiol of the protein P₁ to form a thiol ether or disulfide bond and is the A chain of ricin, an antibody or a fragment of the antibody in an aqueous solution at room temperature, provided that when the disulfide bond is formed, if the protein P₁ is the A chain of ricin, then the disulfide bond is formed between the P₁ and a group of the protein P₂, other than an amino group.

(9) A method of producing an immunotoxin represented by the

following general formula

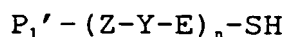


[wherein P' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of an antibody or a fragment of the antibody, A' represents a radical per se or appropriately chemically modified product of protein of the A chain of ricin, and W' represents a covalent bond structure selected from the following groups

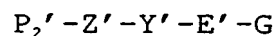


(wherein Z and Z' represent atomic groups belonging to the proteins A and P and are selected from an oxygen atom derived from a hydroxyl group of one tyrosine residue, a carbonyl group derived from one of terminal or free carboxyl groups of glutamic acid and aspartic acid or either one of the A and P, a group derived from a dialdehyde structure obtained after oxidation of the sugar chain of the P with periodic acid, and a -NH- group derived from one of amines at the

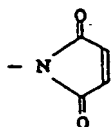
s-position of one ricin residue or one of terminal amines of the A and P, and Z'' is the same as the Z and Z' above but cannot be -NH-, Y and Y' represent functional groups that can covalently bind to one of Z, Z' and Z'' groups of the protein P and A, E and E' represent inactive interposed molecules, and n is 0 or 1)], characterized by reacting a protein represented by the formula



with a protein represented by the following general formula

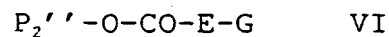


(wherein P_1' and P_2' are atomic groups of the P_1 and P_2 , respectively and bonded to groups belonging to the proteins, respectively, or one atomic group of the proteins P_1 or P_2 obtained by reaction of a sugar chain of an antibody or a fragment of the antibody with periodic acid to cleave it, Z, Z', Y, Y', E and E' are the same as defined above, G represents the following group



or G is an -S-S-X group (where X is an active group) in an aqueous solution at room temperature, provided that when G is an -S-S-X group and P_1' is the A chain of ricin, n is 1 but may be 0, with Z' being other than -NH- in this case)].

(10) A product represented by the following general formula



[wherein P₂' ' is a radical of protein selected from (a) and (b) below

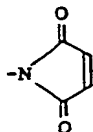
(a) an antibody or a fragment of the antibody, immunoglobulin or a fragment of the immunoglobulin, or a molecule derived from these molecule by artificially modifying any one of functional groups thereof,

(b) the A chain of ricin or a molecule derived from these molecule by artificially modifying any one of functional groups thereof, provided that at least one phenolic hydroxyl group of tyrosine removed from a portion of the protein is excluded from the radical,

the oxygen atom belongs to a phenolic hydroxyl group to be removed from the radial P₂' ' of the protein,

E represents an inactive interposed molecule, and

G represents



Or -S-S-X (where X is an active group)].

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-12630

⑤ Int. Cl.⁴

A 61 K 39/395

識別記号

庁内整理番号

7043-4C

④ 公開 昭和61年(1986)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 6 (全25頁)

④ 発明の名称 免疫毒素およびその製造法

② 特 願 昭60-135215

② 出 願 昭60(1985)6月20日

優先権主張 ③ 1984年6月20日 ③ フランス(FR) ④ 8409703

⑦ 発 明 者 フランツ・ジャンセン フランス国, 34160 カストリエ, アツサ, シュマン・
デ・フレスケ(番地無し)⑦ 発 明 者 ビエール・グロ フランス国, 34100 モンベリエ, リュ・デ・ムーリエ 1
8⑩ 出 願 人 サ ノ フ イ フランス国, 75008 パリ, アブニユ・ジョルジュ・サン
クエム 40

④ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫毒素およびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) リシンのA鎖と抗体をカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。



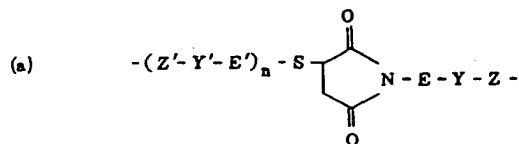
(上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。Wは、チオエーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシステインのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原

子団と結合している。但し、Wがジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の1つがAのシステインのうちの1つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能官を有する介在分子によりタンパクPに結合している。)

(2) リシンのA鎖と抗体Pとをカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。



(上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。



(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'はIgM型の抗体を示し、およびnは1ないし12の範囲の数を示す。)

(8) 一般式



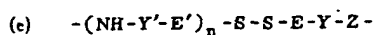
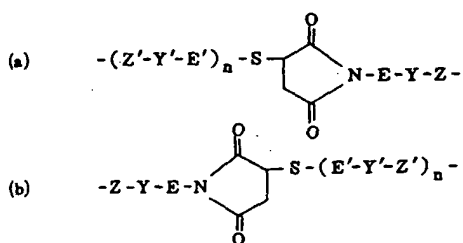
[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。Wは、チオエーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシステインのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原子団と結合している。但し、Wがジスルフィド基を有する場合、前記ジスルフィド基のイオウ

原子の1方がリシンA鎖のシステインに属するものであるとき、他方のイオウ原子はアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合したものである]で示される免疫毒素の製造方法であって、直接または介在基を介して結合した少なくとも1つの遊離チオール基を有するタンパクであって場合に応じて修飾されているリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP₁を、タンパクP₁の遊離チオールと結合してチオールエーテルまたはジスルフィド結合を形成し得る原子団を有する、タンパクP₁とは異なるタンパクであってリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP₂と、室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。但し、ジスルフィド結合が形成される場合にタンパクP₁がリシンのA鎖であるときは、該ジスルフィド結合はアミノ基以外の前記タンパクP₂の基との間に形成される。

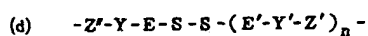
(9) 一般式で示される免疫毒素を製造する方法



[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。

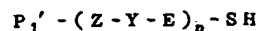


または

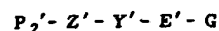


(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水

酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。)で示される免疫毒素の製造方法であって式



で示されるタンパクを次の一般式のタンパクと室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。



(上式中、P₁'およびP₂'はP₁およびP₂の原子

方が抗体または抗体の断片それ自体または適当に修飾したもの（以後Pと称す）を共有結合させて得られる。後者は標的細胞が担っている抗原を特異的に認識し得る。2つのタンパクはジスルフィド結合またはチオエーテル結合により結合されている。

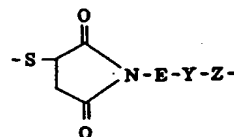
一つの観点に立つと、この発明は抗体PとリシンのサブユニットAを結合させて形成される免疫毒素に関する。それは次の一般式で示される。



上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。Wは、チオ

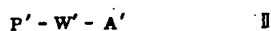
エーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシステインのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子団に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子団に結合している官能基を有する分子が介在して前記原子団と結合している。但し、Wがジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の1つがAのシステインのうちの1つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合している。

2つのタンパク間のチオエーテル結合は、次の型である。

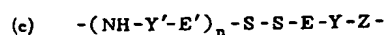
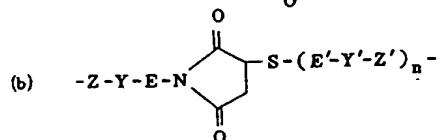
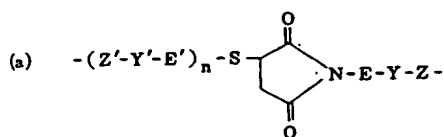


上式中のZ、YおよびEは以下に定義する。

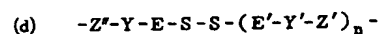
この発明は特に次の一般式の免疫毒素に関する。



上式中のP'およびA'は上記のとおりである。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。



または



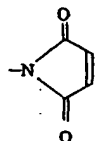
上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミ

ン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。

この発明の免疫毒素は上記の一般式IおよびIIにより簡略された型で示されるが、2価の共有結合構造-W-または-W'-は、少なくとも1つのP分子および少なくとも1つのA分子に結合している。タンパクPおよびAとの結合数は、結合過程に関与する前記タンパクに属する原子団の数に応じて異なる。

例えば、免疫毒素がジスルフィド基を有する

であって前記タンパクに属する基に結合している、または抗体若しくは抗体断片の糖鎖を過ヨウ素酸との反応により開裂して得られるタンパク P_1 または P_2 の1つの原子団である。また Z 、 Z' 、 Y 、 Y' 、 E および E' は上記のとおりであり、 G は次の基を示す。



または G は $-S-S-X$ 基 (X は活性基) である。 G が $-S-S-X$ 基であり、 P_1' がリシンの ϵ 鎖である場合、 n は1であるが0であることもある。しかしこの場合 Z' は $-NH-$ 以外である。

従って、 P および A 双方は、次の基のいずれかを有する。

- (1) 結合に関与する1個以上のチオール基、および
- (2) 上記チオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る1つ以上

施して A 鎖から由来するいかなる分子をも示す。但し、無細胞系において証明できるように、これらのタンパクは真核細胞においてリボソームのタンパク合成を阻害するという性質をなお有するものである。

記号 P' は、上記タンパク P それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクには、それからそれ自体の基の1つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号 A' は、上記タンパク A それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクにはそれからそれ自体の基の1つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号 P_1 は、上記のタンパク A および P の1つを示す。それは、直接かまたは介在分子を経て上記タンパクに結合している遊離チオール基を

の官能基。この発明では、前記チオール基および官能基は天然のタンパク P または A のものであるか、または人工的に修飾されたものである。

以下に上記のタンパクまたはその原子団を表わすために使われる記号の意味および様々な記号を表わすのに使われる表現の意味するところを記載して、内容を明確にしておく。記号 P は、いかなる抗体または抗体の断片すなわちいかなる免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの断片、またはいかなる分子であってその官能基のいずれか1つを人工的に修飾して得られるものをも示す。官能基としてはそれらタンパクに付いている糖鎖構造を含む。但し、修飾されたタンパクは、細胞とりわけ癌細胞の表面に存在する特定抗原をなを特異的に認識し得るものでなければならない。

記号 A はタンパクであるが、植物毒素の A 鎖と称されるサブユニットである。それは天然のリシンから直接得ることもできるし、このタンパクに付いているいかなる官能基を人工的に修

有する。

記号 P_2 は、 P_1 とは異なり、上記のタンパク A および P の1つを示す。それは、上記遊離チオール基と結合し得る1つ以上の官能基を有する。

記号 P_1' は、タンパク P_1 に属する原子団、特に SH 基 (システインの)、 NH_2 基 (タンパクの末端またはリシンの ϵ 位)、 OH 基 (チロシンの) または $COOH$ 基 (アスパラギン酸およびグルタミン酸の) に結合した、 P_1 のラジカルを示す。または P_1' は、 P_1 が抗体または抗体断片である場合、過ヨウ素酸との反応により糖鎖を開裂することによって得られるタンパク P_1 のラジカルを示す。

記号 P_2' は、特徴的な官能基 NH_2 (タンパクの末端またはリシンの ϵ 位)、 OH (チロシン) または $COOH$ (アスパラギン酸およびグルタミン酸) に結合している、タンパク P_2 のラジカルを示す。

例を挙げると、 $P_1'-SH$ は、システインの SH 基がそのまま他の官能基が場合に依じて保護

(1) 包含体の2つの成分すなわち抗体とリシンのA鎖の各生物学的活性を保持する。

(2) この方法で充分な再現性が得られ、また高い収率が保証される。

(3) 得られる包含体中のリシンA鎖と抗体の比の値を調節することを可能にする。

(4) 安定で水溶性の生成物が調製できる。

これらの特徴を有する工程の中で2つのタンパクを結合させるために1つ以上のチオール基が関与するものが好ましい。事実、これらのチオール基は、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を形成させるために特に適している。これらの双方は上記の一般的条件を充す。

一般に、タンパク間の結合を成功させ、特に無秩序な架橋を生じさせないために、結合させる一方のタンパクにだけにひとつまたはひとつ以上のチオール基を導入することが重要である。他方のタンパクは、pH5ないし9の水性溶媒中で30℃を越えない温度にてチオール基と反応して安定な共有結合を形成し得る1つ以上の基

ン残基および257番目のシステイン残基に付いている少なくとも1つのチオール基が未結合であって化学結合を生じやすい。これらすべての場合において、天然のチオ板ル基を有するタンパクP₁はこのような状態で結合工程に使用される。

(B) 天然の状態でタンパクP₁は、タンパクP₂との結合に関与するチオール基を有していない。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパクP₁が天然の免疫グロブリンであって、抗体全体か抗体の断片特に通常F(ab)'またはF(ab)と呼ばれる断片の1つである場合。天然の状態でタンパクP₁が結合に関与する1つのチオール基を持たない場合のいま1つの例は、このタンパクP₁が、2つのシステイン残基それぞれがアルキル化により保護されているか、または化学修飾を受けないリシンのA鎖である場合である。全ての場合において、結合を可能にする1つ以上のチオール基をそのような分子に導入することが妥当といえる。

を備えているだけである。出発物質として使用するタンパクP₁およびP₂の特徴は以下で詳細に記載する。介在分子Eは好ましい分子RからR₀と置換させることができる。これは実施例に述べる。

1. タンパクP₁

このタンパクは、どんな場合も結合に関与する1つか1つ以上のチオール基を有しているで、生じる状況はタンパクP₁の性質に応じて異なる。

(A) 天然の状態でタンパクP₁は、タンパクP₂との結合に関与する1つ以上のチオール基を有している。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパクP₁が、ペプシンの存在下で抗体を限定分解し、続いて高分子間のジスルフィド結合を還元して通常得られるようなF(ab)'として知られる抗体断片である場合である。このことは、タンパクP₁がリシンのA鎖またはA鎖の誘導体である場合にもあてはまる。この場合、天然リシンの171番目のシステイ

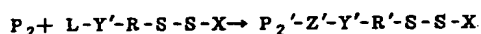
ン残基の型の反応がチオール基を導入するために好ましく用いられる。

(1) 最初の型の反応は、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物との反応である。この酸無水物は、タンパクのアミノ基のアセチル化を可能にする。その後当該チオール基をヒドロキシアミンと反応させることによってアセチル保護基を除くことができる。この方法はすでにアーチーブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス(Archives of Biochemistry and Biophysics)、119、41-49(1967)に記載されている。このように保護基が導入されたチオール基を続いて活性型ジスルフィド基と反応させる場合、ヒドロキシアミンによって前もって保護基をはずさなくて済む可能性がある。事実、この発明の物質を形成する反応体を使ってジスルフィド結合を形成する反応は、遊離チオール基を使った場合と同様にS-アセチル基を使っても生じる。

文献に記載されている他の方法も、修飾され

とが好ましい。A鎖とその誘導体の場合には、N-エチルマレイミドまたはヨード酢酸のようなチオール基に対する通常の試薬との反応により天然のチオール基をアルキル化し、およびミーンス (MEANS) およびフィーニー (FEENEY) によってバイオケミストリー (Biochemistry) 7,2192(1968) に記載された還元的メチル化法に従って天然のNH₂基をメチル化することにより常に遊離のチオール基を持たなくさせ得る。このようにして天然リシンのA鎖に1モル当り6個までのメチル基を導入することができる。このようにして修飾されたタンパクには、生物学的な特性(特に、真核細胞のリボソームにおけるタンパク合成を阻害する能力)が備わっている。抗体または抗体断片さらに第1群のすべての物質の場合には、前記したようにそれらは天然の遊離SH基を持たないので、還元的メチル化を例えばミーンスおよびフィーニーの方法により実施する方がよい。このようにして通常抗体1モル当り数十のメチル基を導入するこ

P₂ からそれ自体活性イオウ原子を有する試薬による置換により得られる。これは次の式で示される。



上式中、P₂ は置換されるべきタンパクを示し、L-Y'は試薬をタンパクに共有結合させる基を示す。官能基L-Y'は、置換されるべきタンパクの構成アミノ酸の側鎖に付いているいずれか1つの基と共有結合し得る基である。これらの基の中で、特に次のものが選出される。

(a) ペプチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基のアミノ基。この場合、L-Y'は特に次のように表わせる。

・カルボジイミド、特に1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミドの如き水溶性誘導体のようなカップリング剤の存在下でタンパクのアミノ基と結合し得るカルボキシル基。

・アミノ基と直接反応して、それをアシル化し得るカルボン酸塩化物。

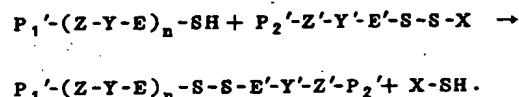
とができる。その場合抗体の細胞表面上の抗原を認識する能力を変化させない。

II タンパク P₂

あらゆる場合、このタンパクは、タンパク P₁ のチオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る1つ以上の官能基を有するタンパクである。これらの官能基は、常にタンパク P₂ に人工的に導入されるが、それがジスルフィド結合によりカップリングされるのかチオエーテル結合によりカップリングされるのかに応じて異なっている。具体的には以下に記載する。

(1) ジスルフィド結合

この場合、包合体の調製は以下の式で表わされる。

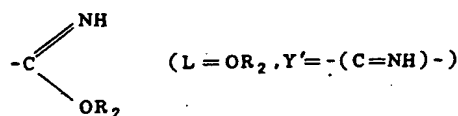


活性イオウ原子により置換されるタンパク P₂ はタンパク P₂ または適切に保護されたタンパク

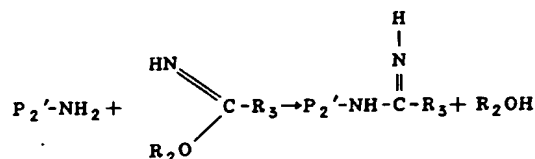
・オルト-またはパラ-ニトロフェニルまたは-ジニトロフェニルエステル、またはN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルのようないわゆる「活性型」エステル。これはアミノ基と直接反応して、それをアシル化し得る。

・コハク酸無水物のようなジカルボン酸の内部無水物。これはアミノ基と自然に反応して、アミド結合を形成させる。または

・イミドエステル基



上式中、R₂ はアルキル基で、次式のようにタンパク P₂ のアミノ基と反応する。



上式中、R₃ は-R-S-SX基を示す。

(b) タンパクに含まれるチロシン残基のフェ

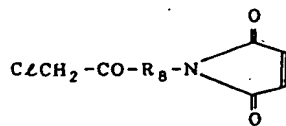
上式中、 R_8 は炭素数1ないし15の脂肪族または芳香族介在分子を示す。それは、続いて使用される反応体に対して不活性である。 Z は、結合に関与するタンパク P_2 の官能基の種類に従って変化する基を示す。すなわち、 Z は、酪素(チロシン残基(チロシル基)のフェノール基のエステルの場合)、 NH (タンパクのアミノ基と活性型カルボキシル基のカップリングの場合)または $NH-CH_2$ (タンパクのアミノ基とクロロメチルケトンの場合)である。

マレイミドで置換されたタンパク P_2 は、それ自体マレイミド基を有する試薬によってタンパクの適当な基を置換することによって、タンパク P_2 自体からまたは適当に保護されたタンパク P_2 から得られる。これらに適した基のうち、特に次のものが選ばれる。

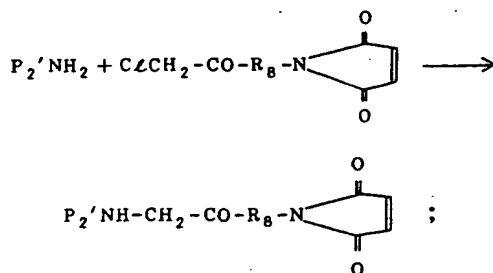
a) ペプチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基(リシル基)の側鎖アミノ基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次のようなものがある。

として手に入る。

1) 次の一般式の試薬

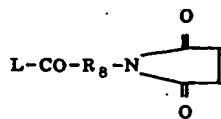


これは次の反応式に従ってタンパク P_2 のアミノ基と反応し得る。



b) タンパクに含まれるチロシン残基のフェノール基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次の一般式で示される。

ア) 次の一般式の試薬

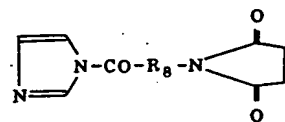


上式中、 $L-CO-$ は次のとおりである。

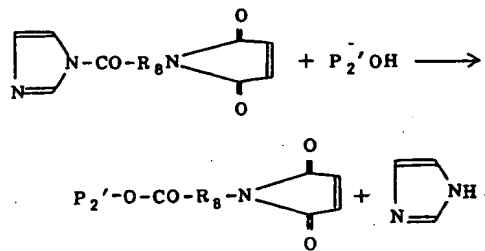
○ カルボキシル基。その場合、カルボジイミドのようなカップリング剤および特に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミドのような水溶性誘導体の存在下でカルボキシル基を活性化したのち、反応が進行する。

○ またはオルト-若しくはパラ-ニトロフェニルまたはジニトロフェニルエステルまたは N -ヒドロキシコハク酸イミドエステル。

これは直接アミノ基と反応し、それをアシル化する。このような試薬の調製は、特にヘルベチカ・ケミカ・アクタ(Helvetica Chimica Acta), 58, 531-541(1975)に記載されている。同じようなクラスの他の薬剤は市販品



これは次の反応式に従ってタンパクのフェノール基と反応する。



マレイミドを有する試薬とタンパク P_2 との反応は均質な液相、最も一般的には水または緩衝液中で進行する。反応体の溶解性を高めるには、水に可溶性の有機溶媒を反応溶液に加えることができる。その最終濃度を、第3ブタノールのような第3アルコールの場合には容量比で20%までにすることができ、ジメチルホルムアミ

Immunology), 122, 2491-2498 (1981) に記載されているものであり、ハイブリドーマ (Hybridoma), 1(1), 13-17 (1981) に記載のハイブリドーマから得られる。

○ 抗-DNPモノクローナル抗体。

〔実施例〕

実施例 1

P₁ は、カルボキシルを介して導入されたSH基を有するリシンのA鎖。

P₂ はアミンを介して導入された活性型ジスルフィド基のあるT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる天然チオール基の保護

リシンA鎖の濃度8mg/mlの水溶液15ml(A鎖4.1マイクロモル)を終濃度1%となるように2-メルカプトエタノールの水溶液で処理した。その水溶液を1時間静置し、続いてpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(300ml/時の速さで4.0時間)に透析した。エルマ

(NEM)40mg(1.33マイクロモル)を溶かした125mMリン酸緩衝液に加えた。溶液のpHを1N塩酸で5.4に調節した。反応を20℃にて2時間進行させ、続いて酢酸ナトリウムの1M水溶液750μlを添加して停止させた。そして反応溶液をpH7の125mMリン酸緩衝液で連続的(300ml/時で20ℓ)に透析して精製した。

続いてタンパクに付いているシスタミンのジスルフィド結合を、2-メルカプトエタノールで還元した(最終濃度3%, 30℃にて1時間)。続くpH7の125mMリン酸緩衝液に対しての透析は上記のとおり続けた。遠心後、修飾されたA鎖(NEM)(濃度1.75mg/ml)の溶液を得た。この生成物をエルマンの方法で測定したところタンパク1分子当りのSH基は0.7であった。濃度勾配ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、この修飾されたA鎖(NEM)は、単一バンドとして現われ、分子量は約30,000であった。

ンの方法[メソッド・イン・エンザイモロジー(Method in Enzymology), 25, 457(1972)]を用いるとリシンA鎖1モル当りSHは0.9当量であった。このSH基をメソッド・イン・エンザイモロジー, 11, 541(1967)に記載の方法によりN-エチルマレイミドで保護した。この際、前段階で得られたリシンA鎖を、A鎖1モル当り20当量のN-エチルマレイミドの存在下で30℃にて2時間インキュベートした。過剰の試薬をpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時の速さで20時間)に透析して除いた。この結果、リシンA鎖濃度7mg/mlの溶液13mlを得た。これには、エルマンの試薬で測定し得るチオール基はもはや存在しなかった。このようにして得られた生成物を以後A鎖(NEM)と呼ぶ。

2) カルボキシル基の修飾

シスタミン塩酸塩1.95ミリモルおよび1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミドの1M水溶液390mlを、A鎖

(B) 修飾抗体の調製

3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロピオン酸11mgを含む水溶液を前もって第3ブタノールに溶かし、それと1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミド6.5mgを、T101抗体濃度10mg/mlの溶液25ml(抗体1.68ミリモル)に加えた。この混合物を30℃にて15分間攪拌し、続いてpH7.0のリン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時で40時間)に透析した。透析後、タンパク溶液を遠心し、1ml当り10.3mgの修飾抗体を含む溶液24.5mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン-2-チオンを343nmで分光分析したところ、得られた抗体は1分子当り1.7個の活性型ジスルフィド基を有することが分かった。

(C) 免疫複合物の調製

上記で得た修飾A鎖(NEM)の溶液7.5ml(0.44マイクロモル)を上記で得た活性型抗体の溶液1.75ml(0.12マイクロモル)に加えて、

質に対して、 ^{14}C -ロイシンの取込みを50パーセント阻害する濃度すなわち「50%阻害濃度」(IC_{50})を求めることができる。完全細胞の ^{14}C -ロイシンの取込みを測定すれば、従来のタンパク合成の測定法によって得られる結果と一致する IC_{50} を決定できることも調べた。

3) 結果

a. テスト-1 (無細胞系)

修飾A鎖の阻害活性を測定した。 IC_{50} は 2.18×10^{-10} モル/ℓとなった。この実験で対照A鎖の IC_{50} は 1.03×10^{-10} モル/ℓであった。従って、修飾してもA鎖の活性はあまり減少しない。

b. テスト-2 (有細胞系)

そのまま抗原T65を有するCEM細胞について、この試験を行なった。包含体の細胞毒性は著しかった(IC_{50} は約 10^{-9} mol/ℓ)。A鎖の値(同一操作条件で IC_{50} は 5×10^{-8})より50倍高かった。10 mM塩化アンモニウムの存在下では包含体の細胞毒性効果は更に増大

($\text{IC}_{50} = 2 \times 10^{-12}$ mol/ℓ)した。このようにこの細胞毒性は、A鎖のそれよりも25,000倍高い。

実施例2

P_1 は、カルボキシを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

P_2 は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製
実施例1に同じ。

(B) 修飾抗体の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-カルボジイミド8.8 mgとマレイミドカプロン酸11 mgを含む溶液を、前もって25℃にて15分間インキュベートし、濃度10 mg/mlのT101抗体溶液10 ml (0.67 マイクロモル)に加えた。その混合物を30℃にて3時間攪拌し、4℃にて40時間pH7の125 mMリン酸緩衝液に対して連続的(5.00 ml/時)透析した。この結果、1 ml当り5.28 mgの修飾抗体を含む

溶液18.5 mlを得た。 ^{14}C -シテインによりマレイミド基を測定したところ、得られた抗体は1分子当り2.8個の活性基を有することが分かった。

(C) 免疫毒素の調製

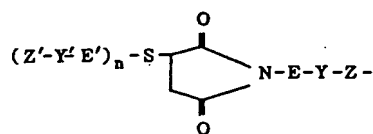
修飾されたリシンA鎖溶液7.5 ml (0.44 マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液3 ml (0.11 マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて1時間静置した。残りのマレイミド基を5.8 マイクロモルのシステインを添加して保護した。30℃にて1時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセフアデックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度0.35 mg/mlの免疫毒素溶液39 ml (13.7 mg)を得た。この溶液は、1 ml当り抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.10 mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)2.1であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A' は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P' は、T101抗体のラジカル。および、

W は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z' は $-\text{CO}-$
- ・ Y' は $-\text{NH}-$
- ・ E' は $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$
- ・ E は $-(\text{CH}_2)_6-$
- ・ Y は $-\text{CO}-$
- ・ Z は $-\text{NH}-$
- ・ n は1。

(D) 活性試験

a. テスト-1 (無細胞系) : 実施例1に同

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

実施例3に同じ。

(B) 修飾抗体の調製

実施例2に同じ。

(C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液 1.2 ml (0.31 マイクロモル) を、ヒドロキシアミン塩酸塩の 1 M 溶液 350 μ l 存在下にて、上記で得られた活性型抗体の溶液 3.5 ml (0.12 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30℃ にて 1 時間インキュベートした。残りのマレイミド基を 6.9 マイクロモルのシステインを添加して保護した。30℃ にて 1 時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファデックス G100 を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度 0.51 mg/ml の免疫毒素溶液 30 ml (15.2 mg) を得た。この溶液は、1 ml 当り抗体とカップリングした修飾 A 鎖 (NEM) 0.08 mg を含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗

体 1 分子当り A 鎖 (NEM) 1 であった。

この結果、前記 II 式の免疫毒素が得られた。

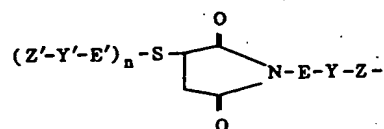
この式中で、

A' は、SH 基が N-エチルマレイミドで保護さ

れたリシンA鎖のラジカル。

P' は、T101 抗体のラジカル。および、

W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z' は -NH-
- ・ Y' は -CO-
- ・ E' は -CH-
|
CH₂COOH
- ・ E は -(CH₂)₆-
- ・ Y は -CO-
- ・ Z は -NH-
- ・ n は 1。

(D) 活性試験

a. テスト - 1 (無細胞系)

実施例3に同じ。

b. テスト - 2 (有細胞系)

実施例1と同じ条件では、活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下の IC₅₀ は 3.3 × 10⁻¹² モル/l であった。このことは、この包合体の細胞毒活性が A 鎖のそれより 5,000 倍高いことを示している。

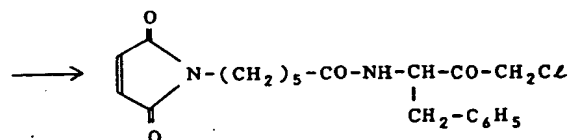
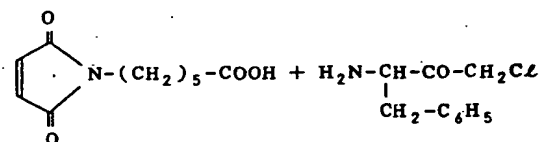
実施例5

P₁ は、アミンを介して導入された SH 基を有する抗 DNP 抗体。

P₂ は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するリシンの A 鎖。

(A) カップリング試薬の調製

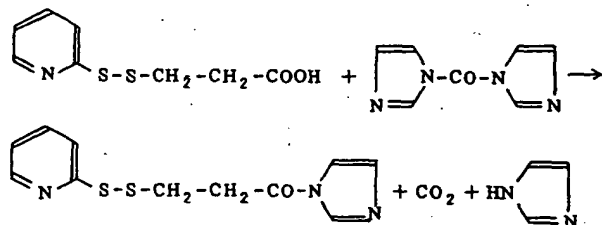
カップリング試薬の調製は、マレイミドカプロン酸を 2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンで濃縮して実施した。



マレイミドカプロン酸 (1 当量) を、メチルクロロフォルメイト (1.1 当量) と N-エチルモルホリン (1.1 当量) 存在下にてテトラヒドロフラン (THF) に溶解した。この混合物を -30℃ にて 5 時間冷却した。冷 THF に溶かした 2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンおよび N-エチルモルホリン (1.1 当量) を徐々に加えた。4℃ にて 1 時間静置して反応を進行させ、更に室温にて 3 時間反応を進行させた。続いて、反応溶液を濾過し、その濾液を真空中で蒸発乾固させた。残渣を酢酸エチルに再溶解させた。その有機層を水で 2 回抽

(A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬には、3-(ピリジン2-イルジスルファニル)プロピオン酸(PDPA)から誘導したイミダゾリドを用いた。このイミダゾリドはPDPAとカルボジイミダゾール(CDI)とから1工程で得られた。



PDPA 430 mgをTHF 2 mlに溶解した。CDI 405 mgをこの溶液に加えた。この混合物を、25℃にて15分間撹拌したところ炭酸ガスが発生した。この反応溶液を精製せずに直接かつ迅速に使用した。

(B) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例1に同じ。

リン酸緩衝液に対して連続的(400 ml/時)透析し、精製した。この結果、1 ml当り8.6 mgの修飾抗体を含む溶液4.1 mlを得た。ヒドロキシアミン塩酸塩の0.5 M溶液0.64 mlをこの抗体溶液に加えた。30℃にて1時間インキュベーションしたのち、試薬を除くために24時間pH 7の125 mMリン酸緩衝液に対して透析し、精製した。エルマンの方法により遊離したSH基を分光測定法で解析したところ、得られた抗体は1分子当り5個の活性基を有していることが分かった。

(D) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液5.2 ml(0.27マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液2.1 ml(0.11マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30℃にて5時間インキュベーションした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度1.1 mg/mlの免疫毒素溶液17 ml

2) チロシンの修飾

THFに溶解したカップリング試薬300マイクロモルを、18 mg(0.6マイクロモル)のA鎖(NEM)をpH 7の125 mMのリン酸緩衝液10 mlに溶かした溶液に滴下した。反応溶液を25℃にて15分間撹拌した。過剰の試薬を除くためにpH 7の125 mMリン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、タンパク濃度1.55 mg/mlの修飾A鎖溶液9.5 mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン2-チオンを343 nmにて分光測定法で解析したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当り1.6個の活性基を有していることが分かった。

(C) 修飾抗体の調製

DMFに濃度17.0 mg/mlとなるように溶かしたSAMSaのDMF溶液25 μlを、濃度9 mg/mlのT101抗体溶液45 ml(0.3マイクロモル)に加えた。その混合物を4℃にて2時間撹拌し、続いて試薬を除くために24時間pH 7の125 mM

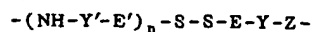
(18.7 mg)を得た。この溶液は、1 ml当り修飾されたA鎖(NEM)0.32 mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当りA鎖(NEM)2であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Y'は -CO-
- ・ E'は -CH₂CH₂-
- ・ Eは -CH-
|
CH₂COOH
- ・ Yは -CO-
- ・ Zは -O-
- ・ nは 1。

上式中、

- ・ Z'は -NH-
- ・ Y'は -CO-
- ・ E'は $\begin{array}{c} -\text{CH}- \\ | \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$
- ・ Eは $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
- ・ Yは -CO-
- ・ Zは -O-
- ・ nは 1。

(C) 活性試験

a. テスト - 1 (無細胞系)

修飾された A 鎖の阻害活性を測定した。IC₅₀ は 1.0×10^{-10} モル/ℓであった。この実験で、対照の A 鎖の IC₅₀ は 1.1×10^{-10} モル/ℓであった。活性がかなり消失しているものの、修飾 A 鎖のタンパク合成阻害能はまだ高かった。

b. テスト - 2 (有細胞系)

実施例 1 と同じ条件下で試験を実施した。活性剤 (500 nM モネンジン) 存在下での IC₅₀ は 3×10^{-11} モル/ℓであった。この値は、A 鎖

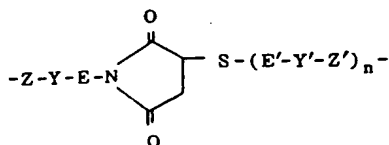
に記載した方法通りセファテックス G 100 を詰めたカラム上でゲル濾過して精製した。この結果、濃度 1 mg/ml の溶液 9.0 ml (20.5 mg) を得た。この溶液は、1 ml 当り修飾された A 鎖 (NEM) 0.27 mg を含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体 1 分子当り A 鎖 (NEM) 1.8 であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシン A 鎖のラジカル。

P'は、AT15E 抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Zは -NH-
- ・ Yは -CO-
- ・ Eは $-(\text{CH}_2)_5-$

のそれ (IC₅₀ は 6×10^{-8} モル/ℓ) より 3×10^3 倍高かった。

実施例 8

P₁ は、天然状態のリシン A 鎖。

P₂ は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有する AT15E 抗体。

(A) 修飾抗体の調製

実施例 2 に記載の方法により AT15E 抗体を修飾した。¹⁴C-システインにより測定したところ、抗体 1 分子当り 2.4 個のマレイミド基が導入されていた。

(B) 免疫毒素の調製

pH 7 の 125 mM リン酸緩衝液にリシン A 鎖を溶かした溶液 8.3 ml (0.2 マイクロモル) を、上記で得られた活性型抗体の溶液 25 ml (0.65 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30℃ にて 1 時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を 9.25 マイクロモルのシステインで保護した。30℃ にて 1 時間インキュベーションし、この反応混合物を、実験例 1

・ n はゼロ

・ m は 1.8。

(C) 活性試験

テスト - 2 (有細胞系)

このテストは、Thy 1.2 抗原を有するマウス T 細胞白血病の細胞を用いた以外は実施例 1 と同じ条件下で実施した。活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下での IC₅₀ は 10^{-9} モル/ℓであった。この値は、A 鎖のそれ (IC₅₀ は 5×10^{-7} モル/ℓ) より 500 倍高かった。

実施例 9

P₁ は、天然状態のリシン A 鎖。

P₂ は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型ジスルフィド基を有する T101 抗体。

(A) カップリング試薬の調製

実施例 6 に同じ

(B) 修飾抗体の調製

2 倍希釈した前記 THF 溶液 34 μℓ (IgG 濃度は 200 当量/モル) を、T101 抗体 12.8 mg を 1.8 ml の pH 7 の 125 mM リン酸緩衝液に溶

上式中、

・ Z は -O-

・ Y は -CO-

・ E は $-(CH_2)_5-$

・ n はゼロ；

・ m は 3。

(D) 活性試験

テスト - 2 (有細胞系)

このテストは、実施例 1 と同じ条件下で実施した。活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下での IC_{50} は 1.7×10^{-12} モル/l であった。この値は、同実験において A 鎖のそれより 3×10^3 倍高かった。

出願人代理人 弁理士 鈴 江 武 彦